

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 A61K 38/22, 47/16, 9/08, C07K 14/505	A1	(11) 国際公開番号 WO97/40850 (43) 国際公開日 1997年11月6日(06.11.97)														
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01449 (22) 国際出願日 1997年4月25日(25.04.97) (30) 優先権データ 特願平8/131226 1996年4月26日(26.04.96) JP 特願平8/303956 1996年10月30日(30.10.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 山崎忠男(YAMAZAKI, Tadao)[JP/JP] 森田俊存(MORITA, Toshiari)[JP/JP] 永井広史(NAGAI, Hiroshi)[JP/JP] 〒171 東京都豊島区高田三丁目41番8号 中外製薬株式会社内 Tokyo, (JP)		(74) 代理人 弁理士 湯浅恭三, 外(YUASA, Kyozo et al.) 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 湯浅法律特許事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書														
(54)Title: ERYTHROPOIETIN SOLUTION PREPARATION (54)発明の名称 エリスロポエチン溶液製剤 (57) Abstract An erythropoietin solution preparation which is excellent in storage stability over a long period of time and contains an amino acid as a stabilizer. In addition to the amino acid, this preparation may further contain a surfactant, a salt or a buffer. <div data-bbox="938 1121 1461 1612"><table border="1"><caption>Data points estimated from the graph</caption><thead><tr><th>L-Arginine hydrochloride concentration (mg/ml)</th><th>Erythropoietin persistence (%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>90</td></tr><tr><td>2</td><td>97</td></tr><tr><td>5</td><td>96</td></tr><tr><td>10</td><td>94</td></tr><tr><td>20</td><td>92</td></tr><tr><td>40</td><td>92</td></tr></tbody></table></div> <div data-bbox="876 1621 1461 1768"><p>a ... Erythropoietin persistence [ratio (%) to initial content]</p><p>b ... L-Arginine hydrochloride concentration (mg/ml)</p></div>			L-Arginine hydrochloride concentration (mg/ml)	Erythropoietin persistence (%)	0	90	2	97	5	96	10	94	20	92	40	92
L-Arginine hydrochloride concentration (mg/ml)	Erythropoietin persistence (%)															
0	90															
2	97															
5	96															
10	94															
20	92															
40	92															

(57) 要約

本発明は、長期保存安定性に優れた、安定化剤としてアミノ酸を含むエリスロポエチン溶液製剤を提供する。

このエリスロポエチン溶液製剤は、アミノ酸のほかに、さらに、界面活性剤、塩あるいは緩衝液を含むこともできる。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア共和国
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア共和国	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ			TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KR	大韓民国	PL	ポーランド		
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	LC	セントルシア	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	RU	ロシア連邦		
EE	エストニア	LK	スリランカ	SD	スーダン		
				SE	スウェーデン		

明細書

エリスロポエチン溶液製剤

技術分野

本発明はエリスロポエチンの溶液製剤に関する。

5

背景技術

エリスロポエチン（以下においてEPOと記載することもある）は、赤血球系前駆細胞の分化、増殖を促進する酸性糖タンパク質ホルモンであり、主として腎臓から産生される。血液中に最も豊富に存在する赤血球は、一定期間機能した後
10 に脾臓などで破壊される（ヒトでは平均寿命が約120日）が、骨髓から絶えず供給されることによって、正常な状態では末梢の全赤血球数は常に一定に保たれている。EPOはこのような生体の赤血球の恒常性維持において中心的な役割を担っている。

大量の再生不良性貧血患者の尿から高純度のヒト尿由来EPOが精製されて以来、これを契機に、ヒトEPO遺伝子のクローニングに成功し、現在では遺伝子工学的な方法によって動物細胞で組換えヒトEPOを大量に生産することが可能になった。また、本願出願人はこの精製したEPOの製剤化（凍結乾燥製剤）に成功し、腎性貧血改善剤などとして市場に製品を供給している。

安定なEPO製剤を市場に供給するための処方設計では、EPOに見られる化学的変化（加水分解、ジスルフィド交換反応など）あるいは物理的変化（変性、凝集、吸着など）を抑制する必要がある。現在市場に供給されている製品には、これら化学的、物理的変化を抑制するために、安定化剤として一般的に使用されているヒト血清アルブミンあるいは精製ゼラチンが添加されている。このうち、ヒト血清アルブミンは輸血に依存する血液製剤であり、医薬品適正使用の面から
20 その添加の可否が問われている。また、前述のアルブミンやゼラチン以外のタンパク質を安定化剤として添加することに関しても、ウィルスのコンタミなどの危険性を完全に回避することは困難である。

25

また、ペプチド医薬品製剤の安定化を図るために、凍結乾燥を施している場合

が多いが、凍結乾燥は、工業的には生産コストの増大を招き、さらに機械トラブルによる危険性の増大を伴うことになる。

以上の理由から、安定化剤としてタンパク質を含有せず、しかも長期の保存にも安定な凍結乾燥製剤に代わるEPOの製剤が求められている。

5

発明の開示

上記目的を達成するために鋭意研究した結果、本発明者らは安定化剤にある種のアミノ酸を添加することにより、ヒト血清アルブミンや精製ゼラチンを含まない安定なEPO溶液製剤となしうることを見だし本発明を完成した。

10 すなわち、本発明は、安定化剤としてアミノ酸を含むエリスロポエチン溶液製剤を提供する。

本明細書中で安定化とは、エリスロポエチン溶液製剤を例えば10℃で2年間以上、又は25℃で6ヶ月以上、あるいは40℃で2週間以上保存し、その際にエリスロポエチンの残存率を90%以上、好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上に保つことを意味する。

15

図面の簡単な説明

図1は、L-アルギニン塩酸塩濃度とエリスロポエチン残存率の関係を示すグラフである。

20 図2は、L-リジン塩酸塩濃度とエリスロポエチン残存率の関係を示すグラフである。

図3は、L-ヒスチジン塩酸塩濃度とエリスロポエチン残存率の関係を示すグラフである。

図4は、各種アミノ酸を添加した製剤の分解物抑制効果を示すSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のパターンである（電気泳動の写真）。レーン1：分子量マーカー、レーン2：アミノ酸無添加製剤、レーン3：L-ロイシン添加製剤、レーン4：L-フェニルアラニン添加製剤、レーン5：L-トリプトファン添加製剤、レーン6：L-セリン添加製剤、レーン7：L-システイン添加製剤、レーン8：L-グルタミン酸ナトリウム添加製剤、レーン9：L-アルギニン塩

25

酸塩添加製剤、レーン 10 : L-ヒスチジン塩酸塩添加製剤。

発明を実施するための最良の形態

本発明の溶液製剤に使用する EPO は、哺乳動物、特にヒトの EPO と実質的に同じ生物学的活性を有するものであり、天然由来のもの、および遺伝子組換え法によって得られたものを含む。遺伝子組換え法によって得られる EPO には天然の EPO とアミノ酸配列が同じであるもの、あるいは該アミノ酸配列の 1 または複数を欠失、置換、付加したもので前記生物学的活性を有するものを含む。本発明における EPO は、いかなる方法で製造されたものでもよく、ヒト尿より種々の方法で抽出し分離精製したもの、遺伝子工学的手法により大腸菌、イースト菌、チャイニーズハムスター卵巣細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。

本発明で安定化剤として添加するアミノ酸には、遊離のアミノ酸ならびにそのナトリウム塩、カリウム塩、塩酸塩などの塩を含む。本発明の溶液製剤には、これらのアミノ酸の 1 種または 2 種以上を組み合わせる添加することができる。好ましいアミノ酸は、D-、L- および D,L- 体のロイシン、トリプトファン、セリン、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジンおよびリジンならびにその塩であり、より好ましいのは L-ロイシン、L-トリプトファン、L-グルタミン酸、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよび L-リジンならびにその塩である。特に好ましいのは、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよび L-リジンならびにその塩である。最も好ましいのは L-ヒスチジンならびにその塩である。

本発明の溶液製剤には好ましくは安定化剤として、実質的にタンパク質を含まない。

本発明の溶液製剤に添加するアミノ酸の添加量は使用するアミノ酸の種類により、後述する試験方法を用いて好ましい範囲を定めることができる。一般には 0.001 ~ 50 mg/ml、アルギニンでは好ましくは 0.1 ~ 40 mg/ml、さらに好ましくは 1 ~ 10 mg/ml であり、リジンでは好ましくは 0.5 ~ 10 mg/ml、さらに好ましくは 1 ~ 10 mg/ml であり、ヒスチジンでは好ましくは 0.5 ~ 10 mg/ml、さらに好ましくは 1.0 ~ 4.0 mg/ml、

最も好ましくは1.0～2.0 mg/mlである。後述するように、L-アルギニン塩酸塩の場合ならびにL-リジン塩酸塩の場合には、遊離のアミノ酸に換算して約1～5 mg/ml、L-ヒスチジン塩酸塩の場合には、40℃-2週間加速試験では遊離のアミノ酸に換算して1～10 mg/mlで、また25℃-6ヶ月加速試験では0.5～5 mg/mlの範囲で最も高いEPO残存率を示した。

本発明の溶液製剤中に含まれるEPOの量は、治療すべき疾患の種類、疾患の重症度、患者の年齢などに応じて決定できるが、一般には100～500000 IU/ml、好ましくは200～100000 IU/ml、さらに好ましくは750～72000 IU/mlである。本発明の溶液製剤は、通常非経口投与経路で、例えば注射剤（皮下又は静注）、経皮、経粘膜、経鼻などで投与されるが、経口投与も可能である。

本発明の溶液製剤には、EPO、アミノ酸の他に、ポリエチレングリコール；デキストラン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、グルコース、フラクトース、ラクトース、キシロース、マンノース、マルトース、シュクロース、ラフィノースなどの糖類；塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機塩；クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウムなどの有機塩；及び場合によってはグルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、 α -モノチオグリセロール、チオ-硫酸ナトリウムなどの含硫還元剤、などの溶液製剤に通常添加される成分を含んでいてよい。好ましい塩は塩化ナトリウムである。さらに、本発明の溶液製剤にはポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルなどの吸着防止剤を添加することが好ましい。特に好ましいポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルは、ポリソルベート20、21、40、60、65、80、81、85であり、最も好ましいのはポリソルベート20及び/又は80である。ポリソルベート20及び/又は80の好ましい添加量は0.01～1 mg/ml、さらに好ましくは0.05～0.1 mg/mlである。

本発明の溶液製剤はこれらの成分をリン酸及び/又はクエン酸緩衝液などの溶液製剤の分野で公知の水性緩衝液に溶解することによって調製できる。リン酸緩衝液は、リン酸一水素ナトリウム-リン酸二水素ナトリウム系が好ましく、クエ

ン酸緩衝液としてはクエン酸ナトリウムの緩衝液が好ましい。本発明の溶液製剤のpHは5.0～8.0、好ましくは6.0～7.0とすることが好ましい。

特開昭64-71818号は、尿素、アミノ酸、非イオン性湿潤剤を含有することを特徴とするヒト蛋白質製剤を開示する。しかし、本発明の溶液製剤は好ましくは尿素を含まない。尿素は例えばエリスロポエチンのような糖鎖タンパク質の長期安定化への寄与が明確でなく、また尿素の分解による生成物とタンパク質との反応が知られており（タンパク質化学3、共立出版、第12章）、このため製剤に悪影響を及ぼすことがあるからである。さらに、一般的には製剤中の添加成分は少ない方がよいと考えられる。

10 本発明の溶液製剤は、通常密封、滅菌されたプラスチックまたはガラス容器中に収納されている。容器はアンプル、バイアルまたはディスポーザブル注射器のような規定用量の形状で供給することができ、あるいは注射用バックまたは瓶のような大用量の形状で供給することもできる。

種々のアミノ酸を含むEPO溶液製剤を調製し、40℃-2週間の加速試験を実施し、試験後の製剤中のEPO含量をRP-HPLC法（逆相高性能液体クロマトグラフィー）によってその添加効果を測定した。その結果、アミノ酸を添加しない溶液製剤に比べて、L-ロイシン、L-トリプトファン、L-グルタミン酸ナトリウム、L-アルギニン塩酸塩、L-ヒスチジン塩酸塩およびL-リジン塩酸塩を添加した溶液製剤におけるEPO残存率の高いことが判明した。また、
15 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析の結果から、L-アルギニン塩酸塩およびL-ヒスチジン塩酸塩については、加速試験後の製剤中に認められるEPO分解物の生成を抑制する効果があることも確認された。

さらに、添加効果が認められたアミノ酸のうちで、L-アルギニン塩酸塩、L-リジン塩酸塩及びヒスチジン塩酸塩について、製剤の安定化に及ぼす添加濃度の影響について検討した。L-アルギニン塩酸塩、L-リジン塩酸塩又はヒスチジンを種々の濃度で添加した製剤を調製し、40℃-2週間の加速試験を行った後の製剤中のEPO残存率は、L-アルギニン塩酸塩、L-リジン塩酸塩のいずれの場合においても濃度が約1～5mg/mlの間で極大になる傾向が認められ、
25 L-ヒスチジン塩酸塩では1～10mg/mlの範囲で最高のEPO残存率を示

した。また、L-ヒスチジン塩酸塩を種々の濃度で添加した製剤を調製し、25℃-6ヶ月の加速試験を行った後のEPO残存率は0.5~5mg/mlの範囲で極大を示した。このことから、L-アルギニン塩酸塩、L-リジン塩酸塩及びL-ヒスチジン塩酸塩には至適添加濃度が存在することが明らかとなった。

- 5 本発明のEPO溶液製剤はヒト血清アルブミンや精製ゼラチンなどの異種タンパク質を含有しておらず、またウィルスなどのコンタミの恐れのない安全な製剤である。また、アミノ酸はこれらの従来の安定化剤に比べて安価であり、かつ製造工程にかかるコストも凍結乾燥製剤に比べて安価であり、経済的にも有利な製剤であるといえる。さらに、本発明の溶液製剤は、緩衝液に溶解することなくそのまま使用できるため、凍結乾燥製剤に比較して使用時の手間が省ける。これらの種々の利点から本発明の産業上の利用性は大である。
- 10

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。

15 実施例

試験方法

調剤溶液1ml中に以下の成分：

EPO	1500国際単位
非イオン性界面活性剤	0.05mg
(ポリソルベート80：日光ケミカル社製)	
塩化ナトリウム	8.5mg
アミノ酸(Sigma社製)	0~40mg

- 20 を含み、10mMリン酸緩衝溶液(和光純薬社製)にてpH6.0に調整した溶液を、5mlのガラスバイアルに1ml充填し、打栓、密封し、溶液製剤に供した。加速試験は同製剤を40℃の恒温槽内に2週間放置した。製剤の評価は、RP-HPLC分析法(WATERS社製)およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析法により行った。
- 25

実施例1：各種アミノ酸添加のEPO残存率に及ぼす効果

以下に記載の各種アミノ酸を添加した溶液製剤を上述の試験方法により調製し、40℃-2週間加速試験を行った後のEPO残存率をRP-HPLC法により算出した。得られた結果を表1に示す。

【表1】

表1 各種アミノ酸を添加した溶液製剤の加速試験後のEPOCH残存率

アミノ酸	添加量 (mg/ml)	40℃-2週間加速試験後の エリスロポエチン残存率 (対初期含量)
無添加	0	83.9 %
L-ロイシン	10	91.6 %
L-フェニルアラニン	10	57.8 %
L-トリプトファン	5	97.0 %
L-セリン	10	85.2 %
L-システイン	10	47.1 %
L-グルタミン酸ナトリウム	10	93.9 %
L-アルギニン塩酸塩	10	93.6 %
L-ヒスチジン塩酸塩	10	99.7 %
L-リジン塩酸塩	10	95.8 %

- 5 L-ロイシン、L-トリプトファン、L-グルタミン酸ナトリウム、L-アルギニン塩酸塩、L-ヒスチジン塩酸塩およびL-リジン塩酸塩が特に顕著なEP

○残存率を示した。

実施例 2 : アミノ酸添加濃度の E P O 残存率に及ぼす効果

以下に示す各種濃度で L - アルギニン塩酸塩を添加した溶液製剤を上述の試験方法により調製し、40℃-2週間加速試験を行った後の E P O 残存率を R P -
5 H P L C 法により算出した。得られた結果を表 2 に示す。

【表 2】

表 2 L-アルギニン塩酸塩を添加した製剤の加速試験後の EPOCH 残存率.

アミノ酸	添加量 (mg/ml)	40℃-2週間加速試験後の エリスロポエチン残存率 (対初期含量)
無添加	0	89.6 %
L-アルギニン塩酸塩	0.1	92.7 %
	1	96.7 %
	5	96.1 %
	10	93.6 %
	20	92.0 %
	40	91.6 %

また、この結果を図 1 にグラフとして示す。

この結果から、L-アルギニン塩酸塩は約 1 ~ 5 m g / m l の範囲で、極大の
E P O 残存率を示した。

10 次いで L - リジン塩酸塩を用いて同様の試験を行ったときの、L - リジン塩酸
塩添加量と加速試験後の E P O 残存率を表 3 に示す。

【表 3】

表 3 L-リジン塩酸塩を添加した製剤の加速試験後のEPOCH残存率.

アミノ酸	添加量 (mg/ml)	40℃-2週間加速試験後の エリスロポエチン残存率 (対初期含量)
無添加	0	88.7 %
L-リジン塩酸塩	0.5	93.1 %
	1	95.8 %
	5	96.3 %
	10	90.2 %

また、この結果を図 2 にグラフとして示す。

この結果から、L-リジン塩酸塩の場合も約 1 ～ 5 mg / ml の範囲で、極大の E P O 残存率を示した。

次いで L-ヒスチジン塩酸塩を用いて同様の試験を行ったときの、L-ヒスチジン塩酸塩添加量と加速試験後の E P O 残存率を表 4 に示す。

【表 4】

表 4 L-ヒスチジン塩酸塩を添加した製剤の加速試験後の E P O C H 残存率

アミノ酸	添加量 (mg/ml)	40℃-2週間加速試験後の エリスロポエチン残存率 (対初期含量)
無添加	0	91.5%
L-ヒスチジン塩酸塩	0.5	95.5%
	1	97.3%
	5	98.1%
	10	99.7%

また、この結果を図 3 にグラフとして示す。L-ヒスチジン塩酸塩では 1 ～ 10 mg/ml の範囲で最高の EPO 残存率を示した。

- さらに、以下に示す各種濃度で L-ヒスチジン塩酸塩を添加した溶液製剤を上
述の試験方法により調製し、25℃-6ヶ月加速試験を行った後の EPO 残存率
5 を RP-HPLC 法により算出した。得られた結果を表 5 に示す。

【表 5】

表 5 L-ヒスチジン塩酸塩を添加した製剤の加速試験後の EPOCH 残存率

アミノ酸	添加量 [mg/ml]	25℃-6ヶ月加速試験後の エリスロポエチン残存率 (対初期含量)
無添加	0	93.2%
L-ヒスチジン塩酸塩	0.5	99.3%
	1	99.9%
	5	97.9%
	10	94.1%

この結果から、0.5 ～ 5 mg/ml の範囲で、特に 1 mg/ml で極大の EPO 残存率を示した。

10 実施例 3：各種アミノ酸添加の EPO 分解物に及ぼす効果

以下に記載の各種アミノ酸を添加した溶液製剤を上述の試験方法により調製し、40℃-2週間加速試験を行った後の EPO 分解物の生成を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析法により検討した。

1) 試料の調製

- 15 EPO に、実施例 1 の表 1 で記載した濃度の各アミノ酸、SDS、グリセリンおよびブロムフェノールブルーを含む 1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8) を加え、60℃で 15 分加熱し、試料溶液とする。

2) 泳動法

試料溶液 10 μl について以下の操作条件で泳動を行う。

- 20 a) 使用機器：スラブ電気泳動装置 (バイオラッド製)
b) 泳動ゲル：SDS-PAGE mini 8-16 (ポリアクリルアミド濃度

8－16%の濃度勾配ゲル) (テフコ製)

c) 泳動温度: 25℃

d) 泳動条件: 25mA定電流 (／ゲル)

3) 染色法 (ウェスタンブロット法)

- 5 泳動したゲルをポリビニリデンジフルオリド膜へ転写後、抗EPOウサギ抗血清、ビオチン標識抗ウサギIgGヤギ抗体およびビオチン化西洋ワサビペルオキシダーゼを用い、3, 3'-ジアミノベンジジン-過酸化水素を基質として発色させる。

4) 結果

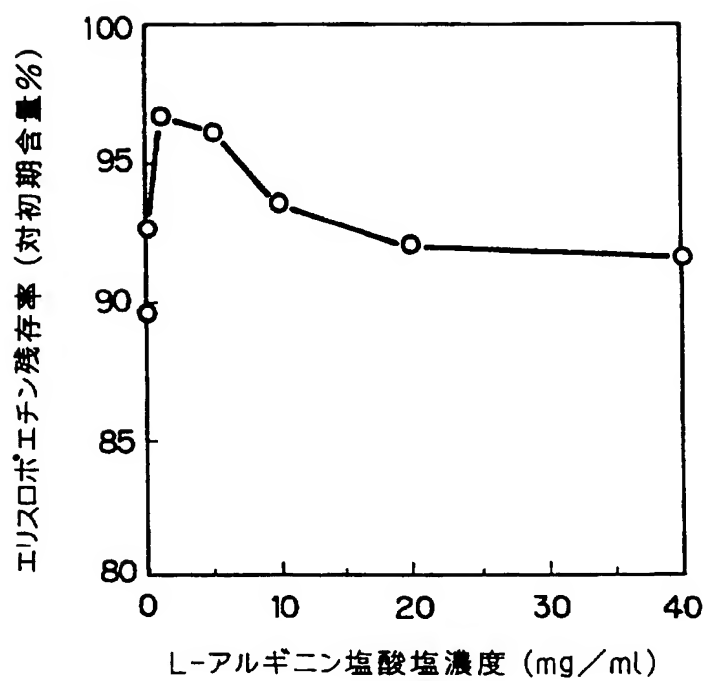
- 10 得られた結果を図4に示す。アミノ酸無添加製剤 (レーン2) に比べ、L-グルタミン酸ナトリウム添加製剤 (レーン8)、L-アルギニン塩酸塩添加製剤 (レーン9)、L-ヒスチジン塩酸塩添加製剤 (レーン10) において、分解物生成抑制の顕著な効果が示された。

請求の範囲

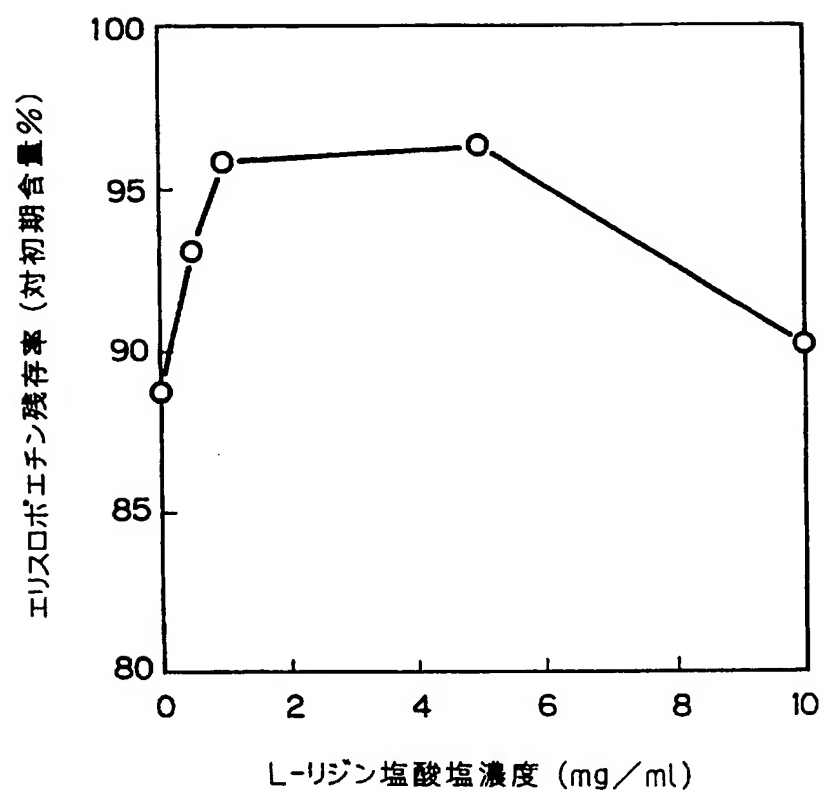
1. 安定化剤としてアミノ酸を含むエリスロポエチン溶液製剤。
2. 安定化剤として、実質的にタンパク質を含まず、アミノ酸を含む請求項1記載の溶液製剤。
- 5 3. アミノ酸がロイシン、トリプトファン、セリン、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジンおよびリジンならびにその塩から選択される1または2以上である請求項1または2記載の溶液製剤。
4. アミノ酸がL-ロイシン、L-トリプトファン、L-グルタミン酸、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよびL-リジンならびにその塩から選択される1
10 または2以上である請求項1～3のいずれかに記載の溶液製剤。
5. 安定化剤としてL-アルギニン、L-ヒスチジンおよびL-リジンならびにそれらの塩から選択される1または2以上を含む請求項1記載の溶液製剤。
6. アミノ酸の濃度が0.1～40 mg/mlである請求項5記載の溶液製剤。
7. 安定化剤がL-ヒスチジンである請求項5記載の溶液製剤。
- 15 8. ヒスチジンの濃度が1.0～4.0 mg/mlである請求項7記載の溶液製剤。
9. 界面活性剤をさらに含む請求項1～8のいずれかに記載の溶液製剤。
10. 界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルである請求項9記載の溶液製剤。
- 20 11. 界面活性剤がポリソルベート20及び／又は80である請求項10記載の溶液製剤。
12. 塩をさらに含む請求項1～11のいずれかに記載の溶液製剤。
13. 塩が塩化ナトリウムである請求項12記載の溶液製剤。
14. 緩衝液に溶解されている請求項1～13のいずれかに記載の溶液製剤。
- 25 15. 緩衝液がリン酸及び／又はクエン酸の緩衝液である請求項14記載の溶液製剤。
16. 尿素を含まない請求項1～15のいずれかに記載の溶液製剤。
17. アミノ酸の、エリスロポエチン溶液製剤の安定化剤としての使用。

18. アミノ酸、界面活性剤及び塩を緩衝液に溶解して得られるエリスロポエチン溶液製剤。

1/4

Fig. 1

2/4

Fig. 2

3/4

Fig. 3

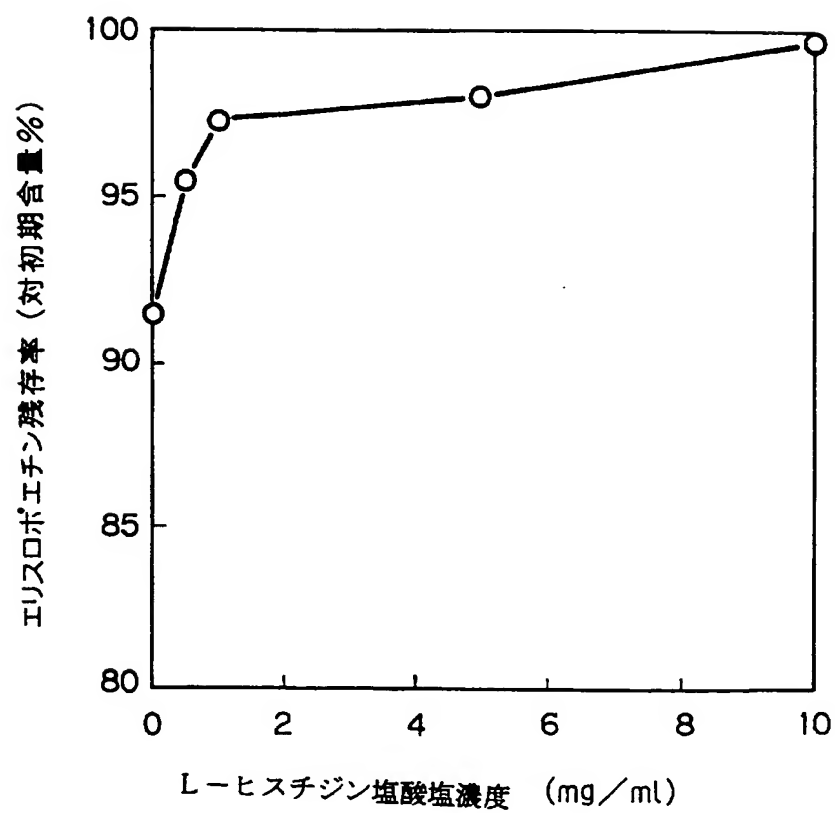
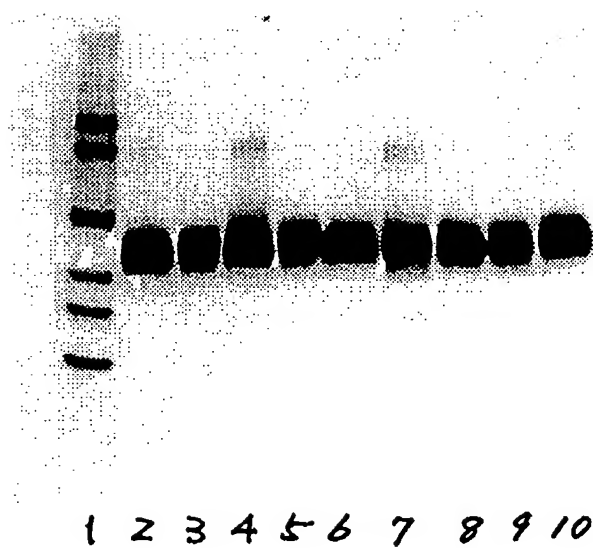


Fig. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01449

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K38/22, A61K47/16, A61K9/08, C07K14/505

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A61K38/00-38/58, A61K47/16, A61K9/08, C07K14/505

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO, 96/28143, A (Boehringer Mannheim GmbH.), September 19, 1996 (19. 09. 96) & DE, 19542837, A	1-6, 9, 12, 13, 16, 17
PX	WO, 96/17593, A (Cortecs Ltd.), June 13, 1996 (13. 06. 96) & AU, 9641224, A	1-3, 9, 16, 17
X Y	JP, 61-97229, A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), October 18, 1984 (18. 10. 84)	1-6, 12-17 7
X Y	JP, 3-170437, A (Boehringerwerke AG.), July 24, 1991 (24. 07. 91) & EP, 430200, A & DE, 3939346, A	1-6, 9, 16, 17 7, 8
X Y	JP, 1-71818, A (Boehringer Mannheim GmbH.), March 16, 1989 (16. 03. 89) & EP, 306824, A & DE, 3729863, A & US, 4992419, A	1-6, 9-15, 17, 18 7, 8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

July 15, 1997 (15. 07. 97)

Date of mailing of the international search report

July 29, 1997 (29. 07. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01449

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 93/3744, A (Boehringer Mannheim GmbH.), March 4, 1993 (04. 03. 93) & EP, 528313, A & JP, 6-510031, A	1-6, 9, 12-17
Y	JP, 62-123130, A (Eisai Co., Ltd.), June 4, 1987 (04. 06. 87) & EP, 218112, A & US, 4837022, A	7, 8
Y	JP, 4-108737, A (Mitsubishi Chemical Corp.), April 9, 1992 (09. 04. 92) (Family: none)	7, 8
Y	JP, 1-42442, A (Eisai Co., Ltd.), February 14, 1989 (14. 02. 89) & EP, 303251, A & DE, 3877277, A & US, 5425943, A	7, 8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ A 61K 38/22, A 61K 47/16, A 61K 9/08, C 07K 14/505		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ A 61K 38/00-38/58, A 61K 47/16, A 61K 9/08, C 07K 14/505		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAS ONLINE		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO, 96/28143, A (Boehringer Mannheim GmbH) 19. 9月. 1996 (19. 09. 96) & DE, 19542837, A	1-6, 9, 12 , 13, 16, 17
PX	WO, 96/17593, A (Cortecs Limited) 13. 6月. 1996 (13. 06. 96) & AU, 9641224, A	1-3, 9, 16 , 17
X Y	J P, 61-97229, A (中外製薬株式会社) 18. 10月. 1984 (18. 10. 84)	1-6, 12-17 7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 15. 07. 97		国際調査報告の発送日 29.07.97
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 聖子 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 3-170437, A (ベーリングウェルケ・アクチェンゲゼルシャフト) 2	1-6, 9, 16
Y	4. 7月. 1991 (24. 07. 91) & EP, 430200, A & DE, 3939346, A	, 17 7, 8
X	JP, 1-71818, A (ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・	1-6, 9-15
Y	ベシュレンクテル・ハフツング) 16. 3月. 1989 (16. 03. 89) & EP, 306824, A & DE, 3729863, A & US, 4992419, A	, 17, 18 7, 8
X	WO, 93/3744, A (ベーリンガー・マンハイム・ゲーエムベーハー) 4. 3	1-6, 9, 12
Y	月. 1993 (04. 03. 93) & EP, 528313, A & JP, 6-510031, A	-17
Y	JP, 62-123130, A (エーザイ株式会社) 4. 6月. 1987 (04. 0	7, 8
Y	6. 87) & EP, 218112, A & US, 4837022, A	
Y	JP, 4-108737, A (三菱化成株式会社) 9. 4月. 1992 (09. 04	7, 8
Y	. 92), ファミリーなし	
Y	JP, 1-42442, A (エーザイ株式会社) 14. 2月. 1989 (14. 02	7, 8
	. 89) & EP, 303251, A & DE, 3877277, A & US, 5425943, A	